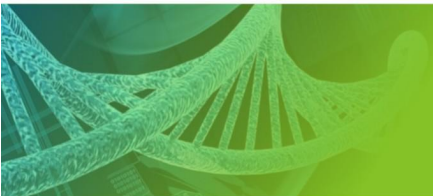


Imagene®

Midi/Maxi Tissue/Cell DNA Kit 中量/大量组织/细胞基因组 DNA 提取试剂盒



CODONX
RESEARCH & ANSWER MORE

FOR RESEARCH USE ONLY
NOT INTENDED FOR DIAGNOSTIC PURPOSES

中量/大量组织/细胞基因组 DNA 提取试剂盒

目录号 DE110

使用说明书

网站: www.codonx.com
咨询电话: 010-56315162
技术支持 QQ: 3090544158

- 1/适用范围
- 2/试剂盒组成、储存、稳定性
- 3/储存事项
- 4/产品介绍
- 5/产品特点
- 6/注意事项
- 7/关于平衡液 BS 的使用
- 8/操作步骤
- 9/常见问题与解决方案

1/适用范围:

适用于快速提取各种动植物细胞/组织基因组DNA。

2/试剂盒组成、储存、稳定性:

试剂盒组成	保存	DE110-01		DE110-02	
		DE110-01	DE110-02	DE110-01	DE110-02
细胞核裂解液 NLS	室温	180 ml	450 ml		
蛋白沉淀液 PPS	室温	60 ml	150 ml		
DNA 溶解液 DS	室温	10 ml	20 ml		
RNase A(10mg/ml)	-20℃	360 μl	900 μl		

本试剂盒在室温储存 12 个月不影响使用效果。

3/储存事项:

1. **环境温度低时**细胞核裂解液 NLS 中某些去污剂成份会析出**出现浑浊或者沉淀**,可在 37℃ 水浴加热几分钟,轻轻旋摇,即可恢复澄清,**不要剧烈摇晃**,以免形成过量的泡沫。
2. 蛋白沉淀液 PPS 可能出现析出和沉淀,可以在 37℃ 水浴几分钟帮助重新溶解,**如果不能完全溶解,也不影响使用效果**,直接取用上层溶液即可。
3. 避免试剂长时间暴露于空气中产生挥发、氧化、pH 值变化,各溶液使用后应及时盖紧盖子。

4/产品介绍:

本试剂盒用于快速的从动植物细胞/组织中提取基因组 DNA。样品研磨或者匀浆后加入细胞核裂解液 NLS,首先在强去污剂或者和蛋白酶 K 协同作用下裂解细胞释放出基因组 DNA,接着加入 RNase A 去除 RNA,然后蛋白沉淀液 PPS 选择性沉淀去除蛋白,最后纯净的基因组 DNA 通过异丙醇沉淀并重溶于 DNA 溶解液。

5/产品特点:

1. 不需要使用有毒的苯酚、氯仿等试剂。

2. 快速，简捷，组织样品操作整个过程可在 1 个小时内完成。
3. 结果稳定，产量高（比离心柱型的产量高一倍以上），OD260/OD280 典型的比值达 1.7~1.9，长度可达 50kb-150kb，可直接用于 PCR，Southern-blot 和各种酶切反应以及文库构建。

6/注意事项

1. **所有的离心步骤均在室温完成**，使用转速可以达到 3,000xg，可容纳 50ml 离心管的台式离心机。
2. 用户需自备异丙醇、70%乙醇、PBS(用于细胞)、液氮研钵/或匀浆器(用于组织)、水浴箱。
3. 开始实验前将需要的水浴先预热好备用。
4. 本试剂盒为溶液型，可以很容易的按照比例扩大或者缩小每次处理的组织细胞量，请联系我们索取其它处理量的操作手册。

7/操作步骤：（实验前请先阅读注意事项）

1. 组织培养细胞
 - a. 收集 $6-8 \times 10^7$ 个细胞到一个 50 ml 离心管；对于贴壁细胞，应该先用胰蛋白酶消化后吹打下来收集。
 - b. 500 x g 离心 5 分钟，使细胞沉淀下来。弃上清，留下细胞团和大约 100 μ l 残留的液体。
 - c. 加 3 ml PBS 重悬洗涤细胞，重复上一步骤，高速涡旋振荡重悬细胞团。
 - d. **对于细胞核裂解液 NLS 裂解效果不好的细胞系（例如 PC12 细胞），在做下一步骤前，应该做几次冻融循环：冻于液氮后，在 95 $^{\circ}$ C 水浴融化，重复 4 次。**
 - e. 加入 9 ml 细胞核裂解液 NLS，用大口径的枪头（剪去枪头尖）轻柔吹打裂解细胞直至看不见细胞团块(如有必要可以 37 $^{\circ}$ C 温育帮助裂解)。
 - f. 接**操作步骤**项下 4。
2. 动物组织（例如鼠肝脑）

a. 9 ml 冰预冷的细胞核裂解液 NLS 加入 300mg 新鲜或者解冻的组织,匀浆器匀浆完全, 将裂解物转入 50ml 离心管。另一种方法: 在液氮中研磨 300mg 组织成细粉后, 转入装有 9ml 冰预冷细胞核裂解液 NLS 的 50ml 离心管, 用大口径枪头吹打混匀。

b. 将裂解物放置在 65°C 水浴 15-60 分钟。

如果需要最大的产量, 可加入 45 μ l 蛋白酶 K (20mg/ml), 颠倒 25 次混匀, 55°C 水浴 3 小时或者过夜。直到组织溶解, 中间不时颠倒混匀。

c. 接**操作步骤**项下 4。

3. 植物组织

a. 在液氮中研磨植物组织 (200mg 干组织或 400mg 湿组织) 成细粉后, 转入装有 9ml 冰预冷的细胞核裂解液 NLS 的 50 ml 离心管, 用大口径枪头吹打混匀。

植物组织起始处理量应该根据叶龄、种类、基因组大小调整。

b. 将裂解物放置在 65°C 水浴 15-60 分钟, 期间至少颠倒 10 次。

4. 加入 18 μ l RNase A (10mg/ml) 至裂解物中, 即 RNase A 终浓度 30 μ g/ml, 颠倒混匀 25 次后, 37°C 温育 15-60 分钟去除残留 RNA。然后**室温冷却至少 5 分钟或者冰浴使回复到室温。**

5. 在回复到室温的裂解物内加入 3ml 蛋白沉淀液 PPS, 在**涡旋振荡器上高速连续振荡混匀 25 秒**。混匀后可能见到一些小的蛋白团块。**冰浴 5 分钟。**

由于样品体积重量小, 用涡旋振荡器振荡混匀产生的剪切力并不会剪切打断基因组 DNA。如果用手振荡混匀, 则不可以用手上下剧烈振荡混匀, 只能适当力度振荡混匀, 否则会剪断基因组 DNA; 但是力度也不能太小, 要保证充分混匀, 将粘稠的裂解物打散开, 否则 DNA 无法和蛋白质沉淀分离开, 离心时会和蛋白质一起沉淀下来, 造成 DNA 丢失或者降低产量。此外混匀不充分也可能造成蛋白沉淀不充分, 最后的产物污染有较大量的蛋白质。因此建议用涡旋振荡器。

6. 2,500xg(可根据需要调整加大离心力)离心 10 分钟。这时应该可以见到管底蛋白沉淀, 也可能见到一些蛋白沉淀漂浮在液体表面。

7. 小心缓慢吸取上清到一个新的 50ml 离心管中, 不要吸到沉淀。

吸取上清时，注意不要吸到管底的和漂浮在液体表面的蛋白沉淀。如果不小心将蛋白沉淀转入新的离心管中，可再次离心 2 分钟后取上清。

- 加入等体积的室温异丙醇（约 9ml），颠倒 30 次混匀或者直到出现棉絮状（丝状）白色 DNA 沉淀。

注意：颠倒混匀的时候，棉絮状（丝状）DNA 有时会粘附着在盖子或者管口处，即使颠倒也不跟下来，这样导致操作者看不到沉淀，误认为没有得到 DNA。解决办法是略去步骤 9，直接 2,000xg 离心 3-5 分钟，弃上清，然后接步骤 11。

- 垂直放置离心管，让白色 DNA 沉淀自然沉到管底，然后尽可能多的吸弃上清，注意不要吸到沉淀。

如果棉絮状（丝状）DNA 沉淀附着有气泡，则会漂浮在液体表面，而不会沉淀下来，要小心避开沉淀吸取上清，不要把沉淀给吸掉了。

- 加入 70%乙醇 9ml 后，颠倒几次漂洗 DNA 沉淀，2,000xg 离心 3-5 分钟，在管底可以见到白色的 DNA 沉淀块，倒弃上清。

- 加入 70%乙醇 5ml，颠倒几次漂洗 DNA 沉淀，2,000xg 离心 1 分钟，倒去上清（注意不要把 DNA 沉淀倒掉了），倒置后在吸水纸上轻敲几下以控干残留乙醇，还可以用枪头小心吸掉管底沉淀周围和管壁的残留乙醇，空气晾干沉淀几分钟。

注意不要干燥过头，否则 DNA 极其难溶；也不能残留太多乙醇，否则乙醇可能抑制下游如酶切反应。

- 加入 500μl DNA 溶解液 DS 重新水化溶解 DNA 沉淀，轻弹管壁混匀，可以放置在 65℃温育 60 分钟（不要超过一小时），也可以在室温或者 4℃放置过夜来重新水化 DNA，中间不时的轻弹管壁帮助重新水化 DNA。

- DNA 可以存放在 2-8℃，如果要长时间存放，可以放置在 -20℃。

8/问题与解决方法

问题	评论与建议
DNA 产量低	*使用了不恰当的裂解液，造成裂解不完全- 建议： 处理材料不要过量。

	<p>*有的组织如肌肉、鼠尾处理困难-建议：尽量将材料研磨细，匀浆完全。</p> <p>* DNA 沉淀在洗涤的时候丢失了-建议：异丙醇沉淀后用乙醇洗涤的过程中，倒弃上清的时候要格外小心，不要把 DNA 沉淀也倒掉了。</p>
<p>A260/A280>1.9</p>	<p>* RNA 酶处理时间不够造成 RNA 污染-建议：可以加大 RNA 酶用量或者延长处理时间到 1 小时。</p> <p>* DNA 剪切断了-建议：严格按照操作步骤，动作不可以太剧烈。</p>
<p>A260/A280 <1.6</p>	<p>*蛋白质残留高-建议：保证重复的裂解液用量和时间；看看后面“未见到蛋白沉淀”问题的评论与建议，确保蛋白通过沉淀去除。另外请参见步骤 7，防止蛋白污染。</p> <p>*测定吸光值时用水稀释 DNA 会降低 A260/A280-建议：使用 TE 缓冲液来稀释 DNA，保证 pH 值大于 8.0。</p> <p>* DNA 没有完全溶解-建议：可在 65℃ 温育帮助重新溶解（不要超过一小时）然后室温或者 4℃ 放置过夜，期间可以颠倒轻弹帮助溶解。</p>
<p>变色的 DNA</p>	<p>*如果异丙醇沉淀后没有迅速进行 70%乙醇漂洗的步骤，有的组织如肝脏提取出的 DNA 可能会变色-建议：异丙醇沉淀离心后，马上进行 70%乙醇清洗的步骤。</p>
<p>DNA 长度 小于 20kb</p>	<p>*样品太旧或者不正确的存放，反复冻融等，造成 DNA 降解-建议：选用新鲜的样品。。</p> <p>*操作不当，造成对基因组 DNA 的剪切-建议：混匀轻柔，不可以用手剧烈振荡离心管，选用大口径的枪头转移或者混匀 DNA。</p>
<p>未见到蛋白沉淀</p>	<p>*加入蛋白沉淀液 PPS 前，裂解混合物没有冷却回室温-建议：冷却至室温或者冰上放置 5 分钟后再加入蛋白沉淀液 PPS。</p> <p>*蛋白沉淀液 PPS 没有和裂解混合物充分混匀-建议：应该连续高速涡旋振荡混匀 25 秒，涡旋并不会剪切断 DNA。</p>

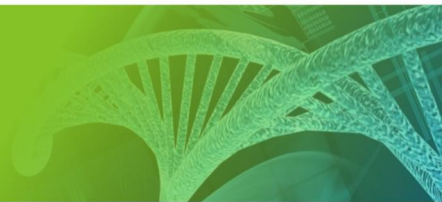
*加入蛋白沉淀液 PPS 后，混合物没有在冰上放 5 分钟-**建议**：离心前在冰上放置 5 分钟帮助沉淀。

DNA 沉淀难以重新溶解水化

*晾干 DNA 沉淀时过度了-**建议**：晾干时密切观察，不要干燥过头，注意应该观察管底的 DNA 沉淀，有时候管壁上的残留乙醇已经挥发，但留下一些水分还没有干，只要管底 DNA 干了就可以加入 DNA 溶解液。可在 65℃ 温育帮助重新溶解（不要超过一小时）然后室温或者 4℃ 放置过夜，期间可以颠倒轻弹帮助溶解。

下游酶切不开或者 PCR 反应受抑制

* DNA 未干燥完全，残留乙醇太多-**建议**：敞开离心管口，在 65℃ 温育几分钟，让乙醇挥发。



CodonX(China) Biotechnology Co., Ltd

Yizhuang Biomedical Park
Building 6, No.88 6th Kechuang St.Economic-Technological Development Area,Beijing,China
Tel: 010-56315162 www.codonx.com